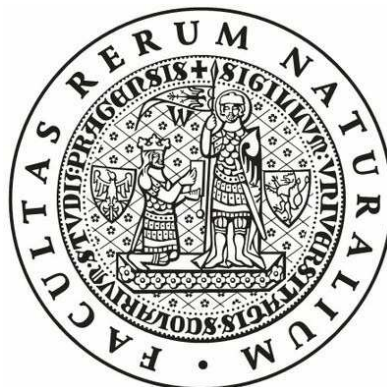


**Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra fyzikální a makromolekulární chemie**

**Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Physical and Macromolecular Chemistry**

Doktorský studijní program: Fyzikální chemie
Ph.D. study program: Physical Chemistry

Autoreferát disertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



Enantioselektivní separační systémy v kapilární elektroforéze

Enantioselective Separation Systems in Capillary Electrophoresis

Mgr. Jana Svobodová

Školitel/Supervisor: Prof. RNDr. Bohuslav Gaš, CSc.

Školitel-konzultant/Supervisor-consultant: Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Prague, 2012

The work presented in this Ph.D. thesis was financial supported by the Grant Agency of the Charles University in Prague, project No.: 101309, by the Grant Agency of Czech Republic, project No.: GAČR 203/08/1428, project Kontakt LH11018 and the long-term research plan of the Ministry of Education of the Czech Republic (MSM0021620857).

Abstract

Chiral separation systems in capillary electrophoresis are in the scope of interest of many research groups all over the world. Therefore, the need to develop reliable theoretical models, which would help to explain phenomena connected with chiral separations or optimization of separation conditions, is obvious. In this thesis several mathematical models and approaches that can fulfill these requirements are presented.

First part of the thesis deals with the determination of rate constants of interconversion of enantiomers by means of dynamic capillary electrophoresis. We focused on mixtures of chiral selectors and formulated a mathematical model, which enables to determine rate constants of interconversion in such systems. Mixtures of chiral selectors are very popular in separation practice due to their enhanced enantioselectivity. The theoretical model established in the thesis is able to explain the separation mechanisms of multi-chiral selector systems and to propose and verify possible ways of their optimization. In addition, the separation mechanism in systems with simultaneous cyclodextrin and borate complexation was revealed.

Finally we present the complete mathematical model of electromigration in systems with complexation agents. The model is implemented into our simulation tool Simul 5 Complex. The model was verified experimentally, and further used to explain some unforeseen phenomena related to chiral separation in capillary electrophoresis. Simul 5 Complex program is shown to be a very powerful tool for optimization of chiral separation in capillary electrophoresis.

Abstrakt

Chirálními separačními systémy v kapilární zónové elektroforéze se zabývá řada vědeckých týmů po celém světě. Z tohoto důvodu je nezbytné vyvíjet i vhodné teoretické modely, pomocí kterých by bylo možno vysvětlit jevy spojené s chirální separací, či by umožňovaly optimalizovat separační podmínky. V této dizertační práci je navrženo několik teoretických modelů, které plně splňují tyto požadavky.

První část práce je zaměřena na určování rychlostních konstant interkonverze pomocí dynamické kapilární elektroforézy. Byl navržen matematický model, který umožňuje určovat rychlostní konstanty interkonverze v systémech obsahujících směs chirálních selektorů. Takovéto systémy jsou velmi oblíbené, jelikož nabízejí lepší enantioseparační schopnosti. Z toho důvodu byl námi navržený teoretický model použit k objasnění separačního mechanismu v systémech se směsí chirálních selektorů a k ověření zavedených postupů pro optimalizaci chirálních separačních podmínek. Současně byl také ověřen separační mechanismus pro systémy se simultánní komplexací s boráty a cyklodextriny.

Na závěr byl představen kompletní matematický model elektromigrace pro systémy s komplexujícími složkami. Tento model byl implementován do našeho simulačního programu Simul 5 Complex. Model byl ověřen experimentálně a použit k objasnění komplikovaných jevů spojených s elektroforetickou separací v kapilární zónové elektroforéze jako elektromigrační disperze. Simul 5 Complex je nepochybně vhodným nástrojem pro optimalizaci chirálních separačních podmínek v kapilární elektroforéze.

Table of Contents / Obsah

Abstract	2
Abstrakt	3

Summary of Ph.D. Thesis

1. Introduction	5
2. Objectives of the thesis	8
3. Results	9
3.1. <i>Determination of local rate constants of interconversion in multi-chiral selector systems</i>	9
3.2. <i>Chiral separation mechanism in complex separation systems</i>	10
3.3. <i>Numerical simulation of separation systems with complexing agents: Simul 5 Complex</i>	12
4. Conclusion	15
References	17

Autoreferát dizertační práce

1. Úvod	19
2. Cíle práce	22
3. Výsledky	23
3.1. <i>Určení lokálních rychlostních konstant interkonverze v systémech se směsí chirálních selektorů</i>	23
3.2. <i>Chirální separační mechanismus v komplexních separačních systémech</i>	24
3.3. <i>Numerické simulace separačních systémů s komplexujícími složkami: Simul 5 Complex</i>	26
4. Závěr	29
Použitá literatura	31

Curriculum Vitae	32
List of Publications:	34
Conferences:	36

1. Introduction

Capillary electrophoresis (CE) is a powerful separation technique. In the field of chiral separations it plays an important role. In contrast to other separation techniques it enables to vary easily a chiral selector and its concentration, and in such way to tune the separation. A need to establish suitable and reliable theoretical models, which would enable to optimize separation conditions and explain the disturbing phenomena connected with chiral separation, seemed to be obvious. Several authors presented different optimization approaches, which assumed different approximations. In 1992 Wren and Rowe utilized the difference in electrophoretic mobilities to determine the optimum chiral selector concentration [1; 2]. Simultaneously, Rawjee and Vigh used the separation selectivity [3; 4] and later the resolution [5] to determine the optimal conditions, pH and cyclodextrin concentration in systems with weak electrolytes and neutral cyclodextrins. Similar approach was later used also by Wren and Rowe for systems with fully charged analytes and neutral cyclodextrins [6].

Separation systems with charged chiral selectors are well known because of their good separation abilities. They extend the applicability of CE for separation of neutral analytes. Based on the theoretical model designated as charged resolving agent migration (CHARM), the group of Vigh was able to prove that the charged chiral selector can provide higher resolution and faster separation than the neutral ones [7]. Other interesting separation systems combine different types of simultaneous complexation, e.g., borate and cyclodextrin, or use mixtures of chiral selectors [8; 9]. Such systems were shown to enhance enantioselectivity in many separation systems. Theoretical models for more complicated systems were not established until now.

Although the current models are very important and widely used, their authors admit that these models are limited only to systems with symmetrical peak shapes as they consider diffusion as the only cause of peak broadening. The other source of significant peak broadening results from electromigration dispersion, which is a nonlinear phenomenon, and can drastically spoil separation. This nonlinear feature can be studied by the numerical simulations.

First computer simulation programs were developed thirty years ago and have been continuously improved since then. Due to the sufficient computational power of today's computers the simulations became a common part of the laboratory practice. Simulations are

utilized to optimize separation conditions, thus, they allow to save experimental time and costs. The existing mathematical models are based on (i) the equations for acid-base or complexation equilibria (ii) the electroneutrality condition and (iii) the continuity equation. The simulation programs used now are Simul 5 [10], introduced by our laboratory, SPRESSO [11; 12] and GENTRANS [13].

In addition to the numerical simulations, another possibility to predict results of separation offers the linearized theory of electromigration. The continuity equation can be formulated as a perturbation problem and the equations can be rewritten in a matrix form. This approach was first introduced by Poppe in 90th [14; 15] and later adopted and generalized by our group. The model, which is applicable for any number of multivalent buffer constituents and analytes, was implemented to our software PeakMaster [16]. The latest version, PeakMaster 5.3, is able to calculate the amplitudes, mobilities and shapes of analyte and system zones [17; 18]. The shape of the zones (extent of EMD) is characterized by two quantities: the relative velocity slope [19] and the nonlinear velocity slope [17].

Only few theoretical models, which enable to simulate separations with complexation agents in CE, are available. However, the currently existing approaches are very limited and are usually suitable only for special systems.

The accurate results of the simulations rely on accurate complexation parameters. Capillary electrophoresis can be advantageously utilized for the determination of physico-chemical parameters. Several methods have been established to determine the complexation constants by electrophoresis. The most commonly used technique is affinity capillary electrophoresis.

Dynamic enantioselective methods are also suitable tools for the determination of rate constants of interconversion (a process when one enantiomer converts to the other one and *vice versa*). If the rate of interconversion is comparable to the rate of separation, the characteristic peak shape profile arises with a plateau between two separated enantiomer peaks. The height of the plateau is closely related to the rate of interconversion. Thus, the classical procedures for the determination of rate constants of interconversion are based on the comparison of the relative plateau height of the simulated and experimental electropherograms.

Interconverting systems in dynamic separation methods were described by Keller and Giddings for the first time in 1960 [20]. The authors proposed the simplified reaction scheme with only one bi-directional reaction, they assumed the same rate constants for the chiral and

achiral environments. Later the complete reaction scheme with all four rate constants, two in achiral and two in chiral environment, was presented [21]. Although this reaction scheme is more complex and offers complete information about the system, most of the authors use the simplified scheme and calculate only apparent rate constants. Unfortunately, with this approach the separate information about achiral and chiral systems is lost. Our group showed how to calculate all four rate constants of interconversion. These rate constants are determined from the dependence of the so called “global” rate constant on chiral selector concentration [22]. This method requires only one set of measurements for both the determination complexation constants and the rate constants of interconversion. At the same time we have introduced the simplified model of electromigration of interconverting analytes. This model has been implemented into the simulation program SimulChir.

2. Objectives of the thesis

The general aim of this thesis is to develop suitable theoretical models for chiral separation systems in CE. These models allow a better understanding of the separation systems and allow easy optimization of separation conditions. The results will not be limited just for the enantioselective environment but could be further applied to all separation systems with complexing/interacting additives to background electrolytes.

The thesis has three major objectives:

1. Determination of local rate constants (in achiral and chiral environments) of interconversion in multi-chiral selector systems
 - Extension of the theoretical approach for the determination of rate constants of interconversion for multi-chiral selectors systems
 - Experimental verification of the model
 - Elucidation of the influence of the chiral selector on the rate of interconversion
2. Chiral separation mechanism in complex separation systems
 - Explanation of enhanced enantioselectivity in multi-chiral selector systems
 - Discussion of usage of the classical optimization approach in multi-chiral selector systems
 - Development of the method for determination of complexation constants in systems with simultaneous cyclodextrin and borate complexation
 - Revealing the role of individual types of complexation (borate, cyclodextrin, mixed) in the separation mechanism
3. Numerical simulations of separation systems with complexing agents: Simul 5 Complex
 - Establishing of the complete theoretical model of electromigration for separation systems with complexing agents
 - Experimental verification of the model
 - Verification of the applicability of the model for the optimization of chiral separation conditions in CE

3. Results

3.1. Determination of local rate constants of interconversion in multi-chiral selector systems

The previously established models for determination of the rate constants of interconversion were derived only for separation systems with a single chiral selector. However, such systems are uncommon because a majority of commercial chiral selectors are mixtures of them (multi-CS systems).

We extended our theoretical model, which enables the determination of the rate constants of interconversion in achiral and chiral environments separately, for multi-CS systems.

We have established a complete theoretical model for electrophoretic separation using mixtures of chiral selectors. We defined new quantities – the overall complexation parameters and overall rate constants, which characterize the behavior of the analyte complexing with the mixture of chiral selectors. Based on the theoretical model we proved that these separation systems can be formally treated as systems with a single chiral selector.

We showed that the previously established procedure for determination of the rate constants of interconversion [22] is applicable also for multi-CS systems. The procedure was verified experimentally using a commercial mixture of sulfated cyclodextrins. We obtained very good agreement between the theoretical predictions and experimental data. Further we tested this method using two different separation systems, which differed in the choice of chiral selector while the analyte was the same. The rate constants for these two systems were compared. We found out that while the rate constants of interconversion are the same in the achiral environment, they can significantly differ in the chiral environment, see Figure 1. This is in very good agreement with the theory.

Simultaneously, we evaluated also a role of the type of the chiral selector on the rate of interconversion. We showed that not only the type of the chiral selector but also temperature has to be considered. A certain temperature exists, at which the chiral selectors influence the rate of interconversion in the same extent. Below and above this temperature the effect of the chiral selectors on interconversion of both enantiomers is opposite.

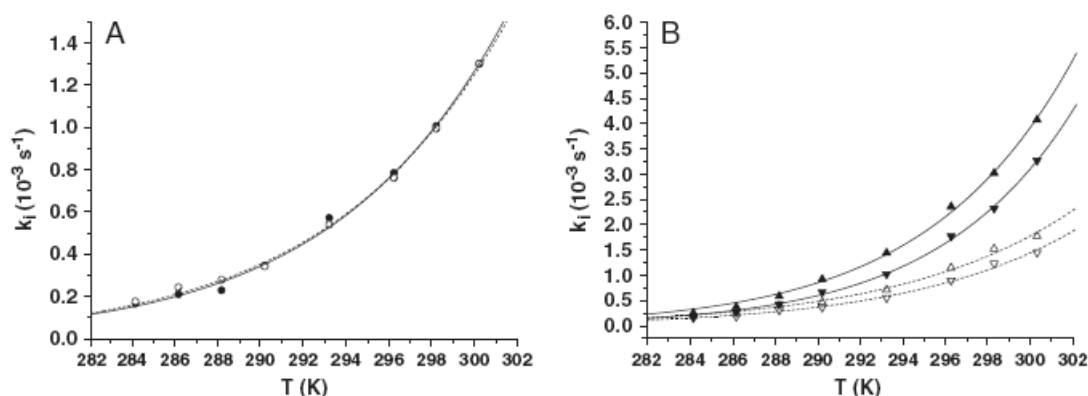


Figure 1 Dependence of the rate constants of interconversion on the thermodynamic temperature in the achiral (A) and chiral (B) environments. Single-CS system - transparent symbols; multi-CS system - black symbols. Circles are used for the data in the achiral environment; upturned and downward triangles are used for the data for the first and the second enantiomers, respectively. Eyring fits: solid and dashed lines for the single-CS and multi-CS systems, respectively.

3.2. Chiral separation mechanism in complex separation systems

Chiral separation systems utilizing mixtures of chiral selectors or those combining different types of complexation are common in analytical practice. They can enhance the enantioselectivity and extend the applicability of electrophoretic methods for various analytes.

Such separation systems are very complex to be described theoretically, however, a suitable theoretical model could explain separation mechanisms and allow do discuss the applicability of the common optimization approaches and choose optimum separation conditions.

Using the theoretical model established within the first objective of the thesis we showed that although separation systems with a mixture of chiral selectors can be treated as a single chiral selector system, these systems are much more complex. We proposed theoretically and verified experimentally that multi-CS systems can combine two classical separation mechanisms: chromatographic and electrophoretic ones. The chromatographic mechanism is based on the different interaction between enantiomers and chiral selector, while the electrophoretic one on the difference in electrophoretic mobilities of enantiomer complexes.

The experimental verification was performed using (i) the single isomer highly sulfated (heptakis(6-*O*-sulfo)- β -cyclodextrin) cyclodextrin and (ii) the commercially available mixture of highly sulfated cyclodextrins as the complexation agents. Complexation parameters

determined by affinity capillary electrophoresis fully confirmed our theoretical predictions. While in the single chiral selector system only complexation constants of both enantiomers are different, in the multi-CS system both the complexation constants and the mobilities of complexes differ. Thus, the mixture of chiral selectors combines both mechanisms and provides enhanced enantioselectivity in comparison with the single chiral selector system possessing only the chromatographic mechanism.

The applicability of the often used optimization approach for the determination of the optimum chiral selector concentration, proposed by Wren and Rowe, was tested. We demonstrated that this approach can totally fail for systems with the mixture of chiral selectors. Therefore, a more comprehensive procedure has to be used to determine the optimum chiral selector concentration in systems where the mobilities of enantiomer complexes differ. We verified that in some cases no optimum chiral selector concentration exists, and the difference in effective mobilities of enantiomers increases monotonically with increasing concentration of chiral selector as demonstrated in Figure 2.

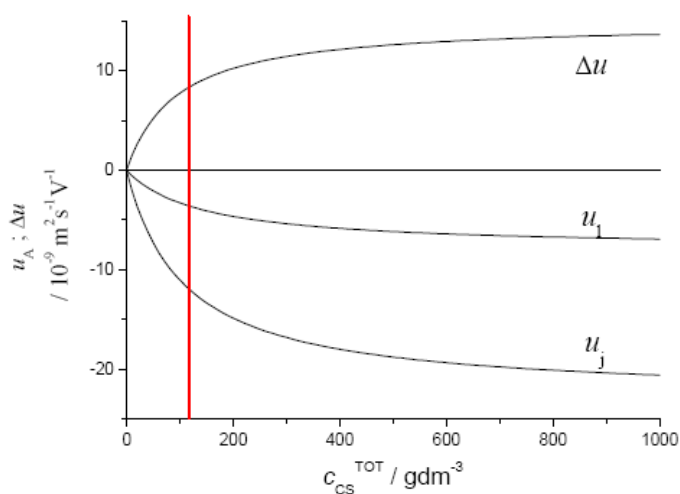


Figure 2 Theoretical dependence of effective mobilities of enantiomers and effective mobility difference on the CS concentration as results from determined distribution constants and limit mobilities for multi-CS system. Red line depicts the optimum concentration of chiral selector calculated using Wren and Rowe equation.

In the next step we focused on the separation systems combining cyclodextrin and borate complexation. Such systems are utilized for separation of vicinal diols and are highly beneficial for separation of neutral analytes using neutral chiral selectors. We established a complete thermodynamic model of electrophoretic separation in such systems and proposed

and tested several methods for determination of complexation parameters. The multiple-nonlinear regression method exhibits the smallest error of estimate and provides the most reliable results. Based on the determined complexation parameters we were able to reveal the role of individual interactions in the separation mechanism.

The complexation of the analyte and cyclodextrin plays the major role in the chiral recognition, while the complexation of the analyte with borate governs electromigration. We were also able to confirm the predictions of other researchers that the formation of mixed analyte-cyclodextrin-borate complexes is very limited if the C-2 or C-3 hydroxyls on the cyclodextrin ring is blocked. Our data showed that the complexation constants for the formation of mixed complexes are ten times lower, thus negligible in comparison to analyte-cyclodextrin or analyte-borate complexations.

Another indisputable advantage of the established theoretical model is that it enables to determine also the complexation constants of interaction of a neutral analyte with a neutral chiral selector. Such data are otherwise not achievable by classical electrophoretic methods.

3.3. Numerical simulation of separation systems with complexing agents: Simul 5 Complex

As discussed in Introduction different optimization approaches exist that enable to find the optimum separation conditions for chiral separations in CZE. However, such approaches are not able to deal with electromigration dispersion of peaks, which is a nonlinear phenomenon. Moreover, the classical models do not consider the constituents of the separation system such as buffer constituents with the exception of the analyte and the chiral selector. To overcome this problem we established a complete dynamical theoretical model of electromigration for systems with complexing agents.

The model is based on the complete set of continuity equations together with acid-base and complexation equilibria. It is applicable for any number of multivalent constituents and one complexation agent in any charge state. The complexation stoichiometry 1:1 is considered. The model was implemented into our simulation program Simul 5 Complex. The program was tested for different electrophoretic setups, which are used for determination of complexation parameters by capillary electrophoresis.

The model was verified experimentally in two steps. At first three separation systems differing in the choice of the chiral selector and the analyte and complexation parameters were selected. The experiments and simulations were performed at the same experimental setup. The experimental and simulated data showed a perfect agreement as regards the positions, shapes and amplitudes of analyte peaks, see Figure 3A and 3B. We were also able to reveal other interesting feature: the addition of a small amount of chiral selector to the separation system can cause severe electromigration dispersion of the peaks due to complexation. With increasing concentration of the chiral selector the peaks become symmetrical again, see Figure 3B.

Based on simulation data we were able to explain that the electromigration dispersion is a direct consequence of the complexation. A low concentration of the chiral selector is not able to “saturate” the complete amount of analyte, thus, the molar fraction of the complexed analyte and consequently its mobility depends strongly on the concentration of the analyte in the sample zone, which causes its electromigration dispersion. This is very important especially in the systems with strong complexation.

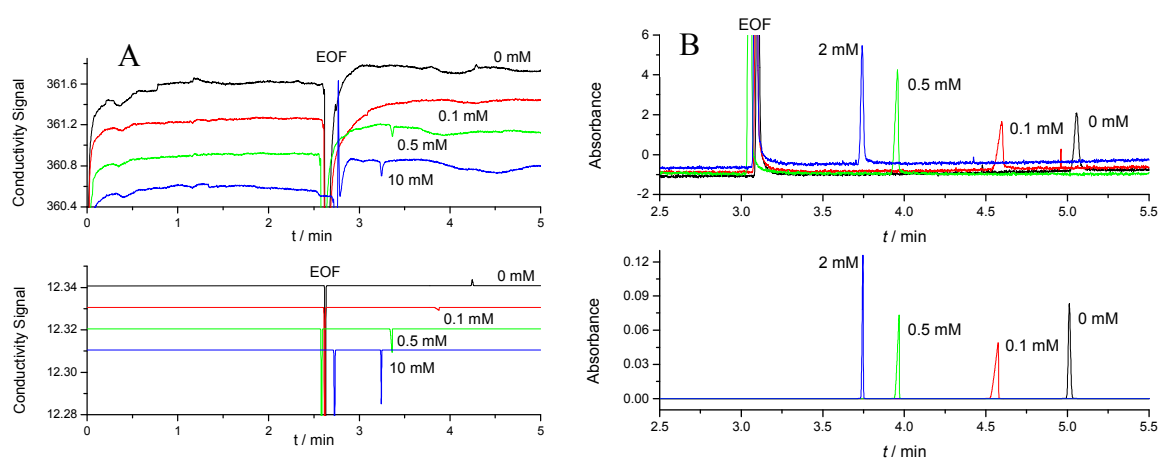


Figure 3 The comparison of the experimental (upper) and simulated (lower) profiles for the analyte R-flurbiprofen and the chiral selector Maltosyl- β -CD. (A) conductivity detection, (B) UV detection. The curves/analyte peaks are marked by the corresponding concentrations of chiral selector. The experimental and simulated conductivity signals were shifted along the y-axis for better visibility, thus the y-axis is only a relative measure of the conductivity signal.

We tested also the applicability of the Wren’s and Rowe’s approach for determination of the optimum chiral selector concentration [1; 2]. Both experimental and simulated data showed that in some cases the separation could not be obtained even when using the optimum

concentration of chiral selector because the enantiomer peaks were significantly distorted by the electromigration dispersion. We predicted by simulation that when the concentration of the chiral selector was increased above the optimum value, the peak shape was improved, however, the separation was not achieved due to the fact that the concentration of the chiral selector was higher than the optimum one. This was fully confirmed by experiments.

Finally, the new version of Simul 5 Complex was tested by systems with the analytes behaving as weak electrolytes. The complexation parameters for such separation systems were found in the literature. Simulation results were compared with the theoretical approach of Rawjee and Vigh, which is based on the three dimensional plotting dependence of separation selectivity on pH and chiral selector concentration [3; 4]. The simulation results were in a very good agreement with the theoretical predictions and also with the experimental results found in the literature. We were able to prove the reversals of the migration order of the analytes with increasing cyclodextrin concentration or pH, which were proposed theoretically but until now never fully proved experimentally. In contrast to the classical theoretical model simulation is able to study some complicated phenomena such as electromigration dispersion or an increase of the mobility of enantiomers when increasing concentration of neutral cyclodextrin. We confirmed that independently on the separation system electromigration dispersion caused by complexation may severely influence the separation results and separation can fail even when the separation selectivity is high. Simulation is a powerful tool for prediction of the results of chiral separations and together with classical optimization approaches can be used to find the best separation conditions.

4. Conclusion

Several theoretical models describing the chiral separation in capillary electrophoresis were established. These models enabled to explain unforeseen phenomena or separation mechanisms and propose the ways to optimize separation conditions.

1. Determination of local rate constants of interconversion in multi-chiral selector systems

We developed the complete theoretical model of interconversion in multi-chiral selector systems. We proposed that multi-chiral selector systems can be formally treated as the systems containing a single chiral selector. The previously established method for determination of rate constants of interconversion in chiral and achiral environments was verified experimentally for multi-chiral selector systems. The obtained data showed a very good agreement with the theory. Thus, we were able to compare the rate constants of interconversion for two separation systems differing in the choice of chiral selector. We proved that while the rate constants in achiral environment are the same, those in the chiral environment significantly depend on the used chiral selector.

2. Chiral separation mechanism in complex separation systems

Separation systems with mixtures of chiral selectors are well known for their very good separation abilities. We showed that the multi-chiral selector systems can combine both chromatographic and electrophoretic separation mechanisms. In this way enhanced enantioselectivity when compared to the single-chiral selector systems can be achieved. We also demonstrated that the classical optimization approaches can fail if applied for multi-chiral selector separation systems.

Other interesting and often used separation system combines the borate and cyclodextrin complexation. We established a simple method for determination of all complexation parameters. Based on the results we were able to reveal a role of the individual interactions in separation mechanism. Analyte-cyclodextrin complexation plays the major role in the chiral recognition mechanism while the migration is governed by analyte-borate interaction. The mixed complexation analyte-borate-cyclodextrin is negligible.

3. Numerical simulations of separation systems with complexing agents: Simul 5 Complex

In the last part of the thesis we presented the complete dynamical theoretical model of electromigration for separation systems with complexing agents. This general and widely applicable model was implemented into our simulation program Simul 5 Complex. The model was verified experimentally in several separation systems. A very good agreement between experimental and simulated data was achieved. We were able to predict and explain the development of electromigration dispersion as well as other subtle phenomena. We showed that electromigration dispersion can be closely related to complexation. Simulation is a powerful tool to avoid severe peak broadening caused by electromigration dispersion, which cannot be predicted when using classical optimization approaches. Thus, the simulations can be advantageously used for optimization of chiral separation conditions in CE.

References

- [1] Wren, S. A. C., Rowe R. C., *J Chromatogr* 1992, *603*, 235-241.
- [2] Wren, S. A. C., Rowe R. C., *J Chromatogr* 1993, *635*, 113-118.
- [3] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J Chromatogr* 1993, *635*, 291-306.
- [4] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J Chromatogr A* 1993, *652*, 233-245.
- [5] Rawjee, Y. Y., Vigh, G., *Anal Chem* 1994, *66*, 619-627.
- [6] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., Payne, R. S., *Electrophoresis* 1994, *15*, 774-778.
- [7] Williams, B. A., Vigh, G., *J Chromatogr A* 1997, *777*, 295-309.
- [8] Stefansson, M., Novotny, M., *J Am Chem Soc* 1993, *115*, 11573-11580.
- [9] Schmid, M. G., Wirnsberger, K., Jira, T., Bunke, A., Gubitz, G., *Chirality* 1997, *9*, 153-156.
- [10] Hruska, V., Jaros, M., Gas, B., *Electrophoresis* 2006, *27*, 984-991.
- [11] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G., *J Chromatogr A* 2010, *1217*, 588-599.
- [12] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G., *J Chromatogr A* 2009, *1216*, 1008-1018.
- [13] Thormann, W., Zhang, C. X., Caslavská, J., Gebauer, P., Mosher, R. A., *Anal Chem* 1998, *70*, 549-562.
- [14] Poppe, H., *Anal Chem* 1992, *64*, 1908-1919.
- [15] Poppe, H., *J Chromatogr* 1990, *506*, 45-60.
- [16] Gas, B., Jaros, M., Hruska, V., Zuskova, I., Stedry, M., *LC GC EUROPE* 2005, *18*, 282-288.
- [17] Hruska, V., Riesova, M., Gas, B., *Electrophoresis* 2012, *33*, 923-930.
- [18] Riesova, M., Hruska, V., Gas, B., *Electrophoresis* 2012, *33*, 931-937.
- [19] Horka, M., Slais, K., *Electrophoresis* 2000, *21*, 2814-2827.
- [20] Keller, R. A., Giddings, J. C., *J Chromatogr* 1960, *3*, 205-220.
- [21] Jung, M., Schurig, V., *J Am Chem Soc* 1992, *114*, 529-534.
- [22] Dubsky, P., Tesarova, E., Gas, B., *Electrophoresis* 2004, *25*, 733-742.

1. Úvod

Kapilární elektoroforéza (CE) je účinnou separační metodou, jejíž význam značně roste zejména v oblasti chirálních separací. Oproti ostatním separačním technikám umožňuje snadno měnit chirální selektory či jejich koncentraci, což lze jednoduše využít k optimalizaci separačních podmínek. Z tohoto důvodu je také nezbytné vytvářet teoretické modely, které by pomohly předpovědět vhodné separační podmínky, a nebo vysvětlit rušivé jevy spojené s chirální separací. V literatuře již bylo prezentováno několik optimalizačních postupů, které ale zahrnují nemalé zjednodušení. V roce 1992 Wren a Rowe využili rozdíl elektroforetických mobilit k určení optimální koncentrace chirálního selektoru [1; 2]. Rawjee a Vigh ve svých publikacích používají separační selektivitu [3; 4], případně rozlišení [5] jako nejvhodnější parametry k určení optimálních separačních podmínek (pH a koncentrace cyklodextrinu) v systémech se slabými elektrolyty v roli analytů a neutrálními cyklodextriny. Podobný postup byl později použit i Wrenem a Rowem pro separační systémy s nabitými chirálními analyty a neutrálními selektory [6].

Separací systémy s nabitými chirálními selektory jsou známy svými dobrými separačními schopnostmi a současně zvyšují použitelnost kapilární elektroforézy také pro systémy s neutrálními analyty. Vědecká skupina Vigha byla na základě svého teoretického modelu CHARM schopna prokázat, že tyto systémy poskytují větší rozlišení a rychlejší separaci než systémy s neutrálními chirálními selektory [7]. Dalšími zajímavými systémy jsou ty, které kombinují různé typy komplexací, např. borátovou komplexaci a komplexaci s cyklodextriny nebo různé chirální selektory [8; 9]. Bohužel teoretické modely pro takovéto komplikované systémy zatím nebyly dostatečně popsány v literatuře.

Ačkoliv současné teoretické modely jsou velmi významné a hojně užívané v praxi, i jejich autoři přiznávají, že berou v úvahu pouze difuzi jako jedinou příčinu disperze. Tvar píku může být ale současně ovlivněn elektromigrační disperzí, která může výrazně ovlivnit výsledek separace. Tyto nedostatky současných teoretických modelů mohou být překonány pomocí numerických simulací.

První simulační programy byly představeny před více než třiceti lety a od té doby jsou soustavně zlepšovány. Díky výraznému pokroku v oblasti počítačů se simulační programy staly běžnou součástí laboratorní praxe. Jsou často využívány k virtuální optimalizaci separačních podmínek, a tak šetří experimentální čas i výdaje. Existující matematické modely

jsou založeny na řešení (i) rovnic pro acido-bazické rovnováhy, (ii) komplexační rovnováhy a (iii) rovnic kontinuity. Mezi nejvýznamnější simulační programy patří Simul 5 [10], který byl vyvinut v naší laboratoři, nebo SPRESSO [11; 12] a GENTRANS [13].

Druhou možnost jak předpovídat výsledky elektroforetických separací nabízí lineární teorie elektromigrace. Díky výhodnému experimentálnímu uspořádání kapilární elektroforézy mohou být rovnice kontinuity řešeny jako “perturbation problem“ a převedeny do maticové formy. Tento postup byl poprvé představen v 90. letech Poppem [14; 15] a později převzat a zobecněn v naší skupině. Výsledný model, který je použitelný pro jakýkoliv počet multivalentních složek pufru a analytů, byl implementován do našeho programu PeakMaster [16]. PeakMaster 5.3 je schopen počítat amplitudy, mobility a tvary píků analytů a systémových píků [17; 18]. Tvar píku (tedy míra elektromigrační disperze) je charakterizován jako “relative velocity slope” [19] a “nonlinear velocity slope” [17].

Bylo publikováno pouze několik teoretických modelů, které by umožňovaly simulovat separace s komplexujícími složkami v kapilární elektroforéze. Avšak i tyto modely jsou velmi omezeny a vhodné jsou pouze pro speciální separační systémy.

Výsledky simulací spoléhají na přesné hodnoty komplexačních parametrů. Kapilární elektroforéza může být použita jako vhodná technika k určování fyzikálně-chemických parametrů látek. Několik elektroforetických metod bylo zavedeno i pro určování komplexačních parametrů, nejrozšířenější z nich je afinitní kapilární elektroforéza.

Dynamická kapilární elektroforéza je vhodnou metodou k určování rychlostních konstant interkonverze (proces, kdy jeden enantiomer přechází na druhý a naopak). Jestliže je rychlost interkonverze srovnatelná s rychlostí separace, pak vzniká klasický separační profil s platem mezi separovanými píky enantiomerů. Výška vznikajícího plata je následně vztažena k rychlosti interkonverze. Klasické postupy k určování rychlostních konstant interkonverze jsou proto založeny na srovnávání relativní výšky plata simulovaných a experimentálních elektroferogramů.

Interkonverzní systémy byly v dynamických separačních metodách poprvé popsány Kellerem a Giddingsem v roce 1960 [20]. Autoři navrhli na základě předpokladu stejných rychlostních konstant v achirálním a chirálním prostředí zjednodušené reakční schéma s jednou zvrtnou reakcí. Později bylo prezentováno kompletní reakční schéma se čtyřmi rychlostními konstantami, dvěma v achirálním a dvěma v chirálním prostředí [21]. Ačkoliv je toto reakční schéma více komplexní a nabízí kompletní informaci o separačním systému, většina autorů

používá zjednodušené schéma pouze se dvěma zdánlivými rychlostními konstantami. Bohužel s využitím zjednodušeného schématu se ztrácí jednotlivé informace o chirální a achirální části systému. Naše skupina navrhla postup, jak počítat všechny rychlostní konstanty na základě závislosti tzv. “globální” rychlostní konstanty na koncentraci chirálního selektoru [22]. Tato metoda vyžaduje pouze jednu sadu měření, která umožňuje současně určit jak komplexační konstanty, tak rychlostní konstanty interkonverze. Současně jsme představili zjednodušený model elektromigrace interkonvertujících analytů, který byl implementován do našeho simulačního programu SimulChir a umožňuje počítat globální rychlostní konstanty interkonverze.

2. Cíle práce

Obecným cílem této práce je vyvinout vhodné teoretické modely pro chirální separační systémy v CE. Tyto modely by pomohly porozumět jevům spojeným s elektroforetickou separací a umožnily by snadnou optimalizaci separačních podmínek. Výsledky těchto modelů nebudou omezeny pouze pro enantioselektivní prostředí, ale mohly by být dále použity pro různé separační systémy s komplexujícími/interagujícími složkami.

Tato práce má tři hlavní cíle:

1. Určení lokálních rychlostních konstant (v achirálním a chirálním prostředí) interkonverze v systémech se směsí chirálních selektorů
 - Rozšíření teoretického postupu pro určování rychlostních konstant interkonverze pro systémy se směsí chirálních selektorů
 - Experimentální ověření teoretického modelu
 - Objasnění vlivu typu chirálního selektoru na rychlost interkonverze
2. Chirální separační mechanismus v komplexních separačních systémech
 - Vysvětlení zvýšené enantioselektivity v systémech se směsí chirálních selektorů
 - Posouzení klasického postupu pro optimalizaci koncentrace chirálního selektoru pro systémy se směsí chirálních selektorů
 - Vývoj metody pro určování komplexačních parameterů v separačních systémech se simultánní borátovou komplexací a komplexací s cyklodextrinem
 - Objasnění role individuálních typů komplexací (komplexace s borátem, cyklodextrinem a směsná komplexace) v separačním mechanismu
3. Numerické simulace separačních systémů s komplexujícími složkami: Simul 5 Complex
 - Navrhnout kompletní teoretický model elektromigrace pro separační systémy s komplexujícími složkami
 - Experimentální ověření modelu
 - Ověření použitelnosti modelu pro optimalizaci chirálních separačních podmínek v CE

3. Výsledky

3.1. Určení lokálních rychlostních konstant interkonverze v systémech se směsí chirálních selektorů

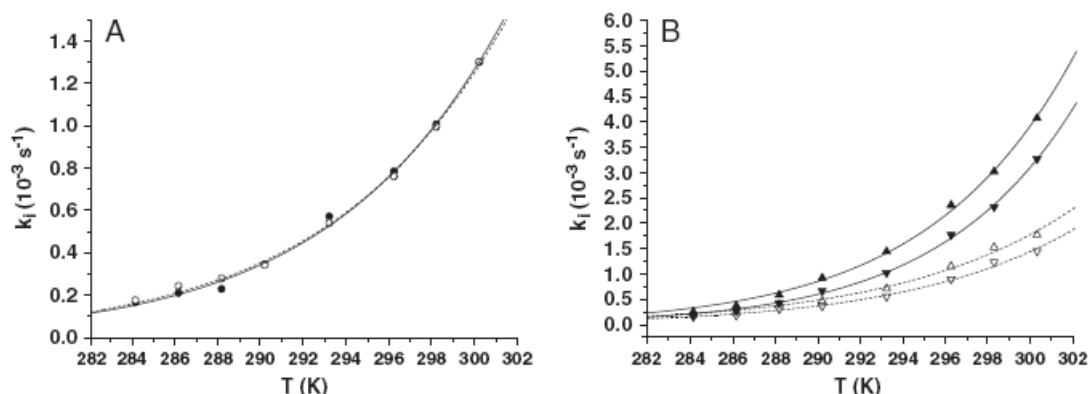
Dříve publikované teoretické modely pro určení rychlostních konstant interkonverze byly odvozeny pouze pro systémy s jedním chirálním selektorem. Avšak takové systémy jsou velmi vzácné, jelikož valná většina dostupných chirálních selektorů se vyskytuje ve formě jejich směsí.

Z tohoto důvodu jsme rozšířili námi zavedený model, který umožňuje určit rychlostní konstanty interkonverze separátně v achirálním a chirálním prostředí i pro systémy se směsí chirálních selektorů.

Zavedli jsme kompletní teoretický model elektroforetické separace s použitím směsí chirálních selektorů. Definovali jsme tzv. “overall” komplexační parametry a “overall” rychlostní konstanty interkonverze, které charakterizují chování analytů komplexujících s celou směsí chirálních selektorů. Na základě tohoto teoretického modelu jsme prokázali, že se systémy se směsí chirálních selektorů lze formálně zacházet jako se systémy, které obsahují pouze jeden chirální selektor.

Současně jsme ověřili, že v naší skupině zavedený postup pro určování lokálních rychlostních konstant interkonverze [22] je použitelný i pro směsí chirálních selektorů. Tento postup byl ověřen experimentálně s využitím komerční směsí sulfatovaných cyklodextrinů. Obdrželi jsme velmi dobrou shodu teoretických predikcí a experimentálních dat. Dále byla tato metoda testována pomocí dvou odlišných separačních systémů, které se lišily ve výběru chirálního selektoru, za použití stejného analytu. Získané rychlostní konstanty interkonverze pro tyto dva systémy byly vzájemně porovnány. Zjistili jsme, že zatímco rychlostní konstanty interkonverze v achirálním prostředí jsou shodné pro tyto dva systémy, ty v chirálním prostředí se mohou výrazně lišit, viz Obr. 1. Tyto závěry velmi dobře souhlasí s teorií.

Současně jsme také diskutovali vliv typu chirálního selektoru na rychlost interkonverze. Ukázali jsme, že významnou roli hraje nejen typ chirálního selektoru ale i teplota. Lze určit teplotu, při které dva chirální selektory ovlivňují rychlost interkonverze stejnou měrou. To znamená, že zatímco nad touto teplotou jeden chirální selektor výrazněji urychluje/zpomaluje interkonverzi než druhý z nich, pod touto teplotou se jejich vliv otáčí.



Obr. 1 Závislost rychlostní konstanty interkonverze na termodynamické teplotě pro achirální (A) a chirální prostředí (B). Přesně definovaný cyklodextrin - prázdné symboly; komerčně dostupná směs chirálních selektorů – plné symboly. Kroužky jsou použity pro data v achirálním prostředí, trojúhelníky pro prostředí chirální. Data jsou proloženy Eyringovou rovnicí: plné čáry - přesně definovaný cyklodextrin, čárkovaně - směs chirálních selektorů.

3.2. Chirální separační mechanismus v komplexních separačních systémech

Chirální separační systémy se směsí chirálních selektorů nebo systémy kombinující odlišné typy komplexace jsou velmi populární v analytické praxi, jelikož jsou známy díky svým výborným enantioselektivním schopnostem a současně zvyšují použitelnost elektroforetických separačních metod pro rozličné analyty.

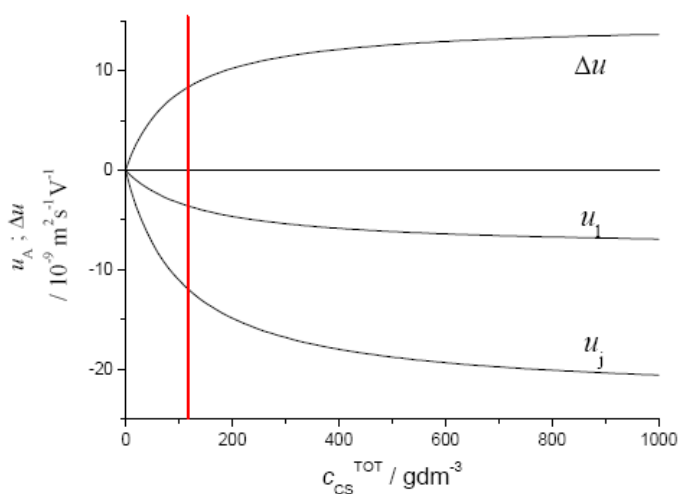
Tyto systémy jsou velmi komplikované, proto je složité navrhnout spolehlivé teoretické modely, které by pomohly vysvětlit jejich separační mechanismy či objasnit možnosti využití klasických optimalizačních postupů k určení nejvhodnějších separačních podmínek.

S využitím teoretického modelu, který byl zaveden v rámci prvního cíle práce, jsme byli schopni prokázat, že se systémy se směsí chirálních selektorů je možno formálně nakládat jako kdyby obsahovaly jen jeden chirální selektor. Předpověděli jsme teoreticky a ověřili experimentálně, že směsi chirálních selektorů mohou kombinovat dva klasické separační mechanismy, a to chromatografický a elektroforetický. Chromatografický mechanismus je založen na rozdílných komplexačních konstantách, naopak elektroforetický mechanismus vychází z odlišných hodnot mobilit komplexů enantiomerů.

Teoretické předpovědi jsme experimentálně ověřili pomocí dvou separačních systémů. Tyto systémy se lišily volbou chirálního selektoru, v prvním systému byl použit přesně definovaný heptakis(6-*O*-sulfo)- β -cyclodextrin a v druhém komerčně dostupný sulfatovaný cyclodextrin, který je směsí jednotlivých isomerů. V obou systémech byl použit shodný

analyt. Komplexační konstanty určené pomocí metody afinitní kapilární elektroforézy plně potvrdily naše teoretické předpovědi. Zatímco v systému s přesně definovaným cyclodextrinem se lišili pouze komplexační konstanty pro jednotlivé enantiomery, v systému se směsí chirálních selektorů byly rozdílné jak komplexační konstanty, tak mobility komplexů. Můžeme tedy shrnout, že směsí chirálních selektorů mohou kombinovat oba separační mechanismy a vykazovat větší enantioselektivitu než ty s jedním chirálním selektorem.

Testována byla také použitelnost nejrozšířenějšího optimalizačního postupu, který byl zaveden Wrenem a Rowem. Ukázali jsme, že tento postup může zcela selhávat v systémech se směsí chirálních selektorů. Pokud se liší mobility komplexů jednotlivých enantiomérů, je nutné použít komplexnější metodu určení optimální koncentrace chirálního selektoru. Ověřili jsme, že v takovýchto systémech dokonce nemusí existovat žádná optimální koncentrace chirálního selektoru a rozdíl efektivních mobilit enantiomérů může monotónně růst s rostoucí koncentrací chirálního selektoru jak je zjevné z Obr. 2.



Obr. 2 Teoretická závislost efektivní mobility enantiomérů a rozdílu efektivních mobilit na koncentraci chirálního selektoru vynesena pomocí experimentálně získaných komplexačních parametrů. Červená čára odpovídá optimální koncentraci chirálního selektoru vypočtené pomocí Wrenovy Rowovy rovnice.

Následně jsme se zaměřili na separační systémy, které kombinují borátovou komplexaci a komplexaci s cyclodextrinem. Tyto systémy jsou často používány pro separaci vicinálních diolů, jsou velmi výhodné zejména pro separaci neutrálních analytů s použitím neutrálních chirálních selektorů.

Vypracovali jsme kompletní teoretický model elektroforetické separace v těchto systémech. Na základě tohoto modelu jsme byli schopni navrhnout a otestovat několik metod pro určování komplexačních parameterů v systémech kombinujících dva typy komplexace. Námi navržená metoda založená na multidimenzionální nelineární regresi prokázala nejmenší chybu odhadu a poskytovala nespolehlivější data.

Na základě takto určených komplexačních parameterů jsme byli schopni diskutovat roli jednotlivých interakcí v separačním mechanismu. Komplexace analytu s cyklodextrinem hraje hlavní roli při chirálním rozlišení, zatímco interakce borátu s cyklodextrinem řídí elektromigraci. Současně jsme potvrdili předpovědi jiných autorů, že v systémech s cyklodextriny s blokovanou C-2 nebo C-3 skupinou je velmi omezena tvorba směsných komplexů. To se potvrdilo 10krát menšími hodnotami komplexačních konstant pro tvorbu směsných komplexů než v případě komplexace analyt-cyklodextrin, či analyt-borát.

Další neopomenutelnou výhodou tohoto teoretického postupu je, že umožňuje určit komplexační konstanty i pro komplexaci neutrální analyt-neutrální chirální selektor. Tato data by jinak nebyla běžnými elektroforetickými technikami dostupná.

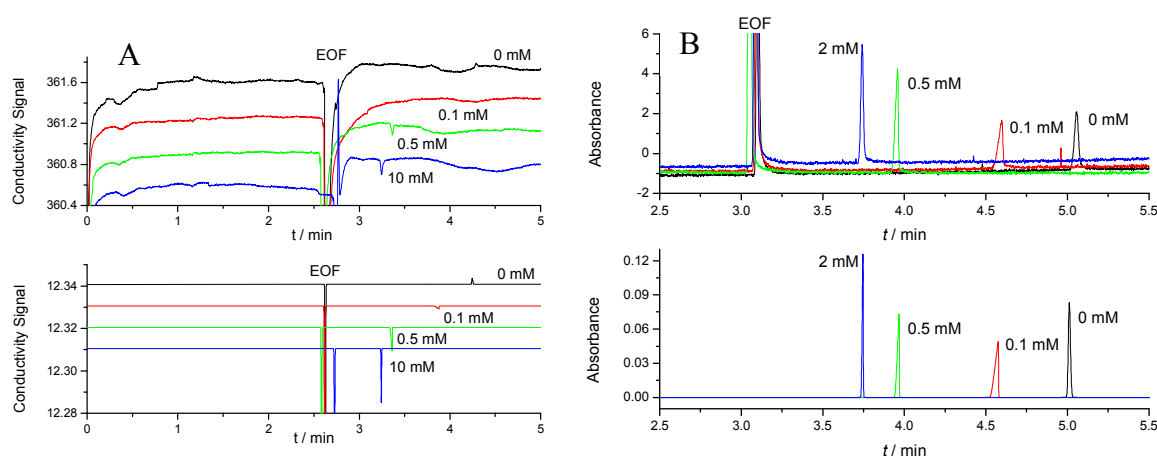
3.3. Numerické simulace separačních systémů s komplexujícími složkami: Simul 5 Complex

Jak již bylo diskutováno v Úvodu, v literatuře se vyskytují rozličné optimalizační postupy, které umožňují najít nejvhodnější separační podmínky. Avšak pomocí těchto postupů nelze popsat jakýkoliv nelineární jev způsobující disperzi píků, např. elektromigrační disperzi. Kromě toho, klasické modely nejsou schopny uvážít žádné jiné složky separačního systému než analyt a chirální selektor, např. složky pufru. Abychom odstranili nedostatky těchto modelů, vyvinuli jsme kompletní teoretický model elektromigrace pro systémy s komplexujícími složkami.

Model je založen na řešení rovnic kontinuity současně s acido-bazickými a komplexačními rovnováhami. Je použitelný pro jakýkoliv počet multivalentních konstituentů a jedno komplexační činidlo v jakémkoliv disociačním stavu. Předpokládá se komplexační stechiometrie 1:1. Takto zavedený model byl implementován do našeho simulačního programu Simul 5 Complex. Program byl následně testován pro různá elektroforetická uspořádání, která se používají k určování komplexačních konstant.

Model byl také ověřen experimentálně ve dvou krocích. V první fázi byly vybrány tři separační systémy, které se lišily volbou chirálního selektoru, analytu a komplexačními parametry, viz Obr.3. Experimenty a simulace byly provedeny při zcela stejných experimentálních podmínkách. Experimentální a simulované elektroferogramy plně souhlasí co se týče pozice, tvarů a amplitud píků analytu. Současně jsme byli schopni odhalit další zajímavý jev, přidavek malého množství chirálního selektoru do systému vyvolává výraznou elektromigrační disperzi. Další zvyšování koncentrace chirálního selektoru opět vede k symetrickým tvarům píkům, jak vidno z Obr. 3.

Na základě simulovaných dat jsme byli schopni vysvětlit, že elektromigrační disperze má přímou souvislost s komplexací. Nízká koncentrace chirálního selektoru není dostatečná, aby “nasytila” kompletní množství analytu, proto stupeň komplexace a tedy i efektivní mobilita analytu závisí na jeho koncentraci v zóně a projevuje se elektromigrační disperze. Toto je extrémně významné zejména v systémech se silnou komplexací.



Obr. 3 Srovnání experimentálních (nahore) and simulovaných (dole) elektroforegramů pro analyt R-flurbiprofen and chirální selektor Maltosyl- β -CD. (A) vodivostní detekce, (B) UV detekce. Jednotlivé záznamy případně píky analytu jsou označeny příslušnými koncentracemi chirálního selektoru. Experimentální a simulované záznamy z vodivostní detekce byly z důvodu větší přehlednosti posunuty podél y-ové osy.

Testovali jsme také použitelnost Wrenova a Rowova postupu pro určování optimální koncentrace chirálního selektoru [1; 2]. Experimentální i simulovaná data prokázala stejný trend. Při použití optimální koncentrace nelze dosáhnout separace, jelikož píky enantiomerů jsou výrazně ovlivněny elektromigrační disperzí. Pomocí simulací jsme předpověděli, že zvýšení koncentrace chirálního selektoru umožňuje zlepšit tvar píků, což bylo potvrzeno

experimentálně. Separace píků ovšem ani tak nebylo s použitím vybraného chirálního selektoru dosaženo.

Závěrem byla nová verze Simulu 5 Complex testována pro elektroforetické separační systémy se slabými elektrolyty v roli analytů. Komplexační parametry pro odlišné separační systémy byly nalezeny v literatuře. Výsledky simulací byly porovnány s předpovědí teoretického modelu Rawjeeho a Vigha, který je založen na vynesení třídimensionální závislosti separační selektivity na pH a koncentraci chirálního selektoru [3; 4]. Výsledky simulací jsou ve velmi dobré shodě s teoretickými předpověďmi a také s publikovanými experimentálními závěry. Byli jsme schopni prokázat například změny elektromigračního pořadí enantiomerů s rostoucí koncentrací cyklodextrinů či pH, které byly navrženy teoreticky, ale nikdy nebyly zcela prokázány experimentálně. Na rozdíl od klasického teoretického postupu jsme byli schopni demonstrovat i další komplikované jevy např. rostoucí mobilitu enantiomerů s rostoucí koncentrací neutrálního chirálního selektoru, nebo elektromigrační disperzi. Potvrdili jsme, že nezávisle na separačním systémem, elektromigrační disperze spojená s komplexací může závažně ovlivnit výsledek separace, a zapříčinit selhání separace dokonce i při vysokých separačních selektivitách.

Prokázali jsme, že simulace jsou výkonným nástrojem pro předpověď výsledků chirálních separací a společně s dalšími klasickými optimalizačními postupy mohou být použity k nalezení optimálních separačních podmínek.

4. Závěr

Bylo zavedeno několik teoretických modelů popisujících chirální separaci v kapilární zónové elektroforéze. Tyto modely umožňují objasnit skryté jevy spojené s elektroforetickou separací, navrhnout separační mechanismy a optimalizovat separační podmínky.

1. Určení lokálních rychlostních konstant interkonverze v systémech se směsí chirálních selektorů

V rámci prvního cíle práce jsme navrhli kompletní teoretický model interkonverze v systémech se směsí chirálních selektorů. Prokázali jsme, že s těmito systémy je možno formálně zacházet jako by obsahovaly pouze jeden chirální selektor. Postup pro určování rychlostních konstant interkonverze byl ověřen i pro systémy se směsí chirálních selektorů. Výsledná experimentální data prokázala velmi dobrou shodu s teorií. Z toho důvodu jsme byli schopni porovnat data pro dva různé separační systémy lišící se ve volbě chirálního selektoru. Dokázali jsme, že zatímco rychlostní konstanty v achirálním prostředí jsou shodné nezávisle na chirálním selektoru, ty v chirálním prostředí se mohou výrazně odlišovat v závislosti na použitém chirálním selektoru. Ukázali jsme, že existuje jistá teplota, při které dva chirální selektory ovlivňují rychlost interkonverze stejně, pod a nad touto teplotou se míra vlivu jednotlivých chirálních selektorů otáčí.

2. Chirální separační mechanismus v komplexních separačních systémech

Separací systémy se směsí chirálních selektorů jsou všeobecně známy pro svoje dobré separační schopnosti. Bylo ukázáno, že směsi chirálních selektorů mohou kombinovat oba separační mechanismy, chromatografický i elektroforetický, což může zlepšit enantiosektivitu těchto systémů ve srovnání se systémy obsahujícími pouze jeden chirální selektor. Současně jsme prokázali, že klasické optimalizační postupy mohou zcela selhávat v systémech se směsí chirálních selektorů.

Další významný a často používaný separační systém kombinuje borátovou komplexaci s komplexací s cyklodextrinem. Byla zavedena jednoduchá metoda pro určení všech komplexačních parametrů v těchto systémech. Na základě získaných hodnot komplexačních parametrů jsme byli schopni diskutovat roli jednotlivých druhů komplexace v těchto separačních systémech. Zatímco komplexace analyt-cyklodextrin hraje zásadní roli

v chirálním rozpoznávání, interakce borát-analyt řídí elektromigraci. Směsná komplexace (analyt-borát-cyklodextrin) je oproti těmto dvěma zanedbatelná.

3. Numerické simulace separačních systémů s komplexujícími složkami: Simul 5 Complex

V rámci posledního cíle práce je prezentován kompletní teoretický model elektromigrace v separačních systémech s komplexujícími složkami. Tento model je velmi obecný a lze jej použít pro celou řadu separačních systémů. Byl implementován do našeho simulačního programu Simul 5 Complex. Následně byl ověřen experimentálně s použitím několika separačních systémů. Obdrželi jsme velmi dobrou shodu experimentálních a simulovaných dat. Současně jsme byli schopni předpovědět a vysvětlit vývoj elektromigrační disperze a dalších komplikovaných jevů. Prokázali jsme, že elektromigrační disperze je úzce spojena s komplexací. Simulace se současně ukázaly být velmi dobrým nástrojem, který umožňuje nalézt vhodné separační podmínky k omezení elektromigrační disperze. Tyto podmínky nelze najít klasickými optimalizačními postupy. Z toho důvodu mohou být simulace výhodně použity k optimalizaci separačních podmínek v chirálních separacích pomocí kapilární elektroforézy.

Použitá literatura

- [1] Wren, S. A. C., Rowe R. C., *J Chromatogr* 1992, 603, 235-241.
- [2] Wren, S. A. C., Rowe R. C., *J Chromatogr* 1993, 635, 113-118.
- [3] Rawjee, Y. Y., Staerk, D. U., Vigh, G., *J Chromatogr* 1993, 635, 291-306.
- [4] Rawjee, Y. Y., Williams, R. L., Vigh, G., *J Chromatogr A* 1993, 652, 233-245.
- [5] Rawjee, Y. Y., Vigh, G., *Anal Chem* 1994, 66, 619-627.
- [6] Wren, S. A. C., Rowe, R. C., Payne, R. S., *Electrophoresis* 1994, 15, 774-778.
- [7] Williams, B. A., Vigh, G., *J Chromatogr A* 1997, 777, 295-309.
- [8] Stefansson, M., Novotny, M., *J Am Chem Soc* 1993, 115, 11573-11580.
- [9] Schmid, M. G., Wirnsberger, K., Jira, T., Bunke, A., Gubitz, G., *Chirality* 1997, 9, 153-156.
- [10] Hruska, V., Jaros, M., Gas, B., *Electrophoresis* 2006, 27, 984-991.
- [11] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G., *J Chromatogr A* 2010, 1217, 588-599.
- [12] Bercovici, M., Lele, S. K., Santiago, J. G., *J Chromatogr A* 2009, 1216, 1008-1018.
- [13] Thormann, W., Zhang, C. X., Caslavská, J., Gebauer, P., Mosher, R. A., *Anal Chem* 1998, 70, 549-562.
- [14] Poppe, H., *Anal Chem* 1992, 64, 1908-1919.
- [15] Poppe, H., *J Chromatogr* 1990, 506, 45-60.
- [16] Gas, B., Jaros, M., Hruska, V., Zuskova, I., Stedry, M., *LC GC EUROPE* 2005, 18, 282-288.
- [17] Hruska, V., Riesova, M., Gas, B., *Electrophoresis* 2012, 33, 923-930.
- [18] Riesova, M., Hruska, V., Gas, B., *Electrophoresis* 2012, 33, 931-937.
- [19] Horka, M., Slais, K., *Electrophoresis* 2000, 21, 2814-2827.
- [20] Keller, R. A., Giddings, J. C., *J Chromatogr* 1960, 3, 205-220.
- [21] Jung, M., Schurig, V., *J Am Chem Soc* 1992, 114, 529-534.
- [22] Dubsky, P., Tesarova, E., Gas, B., *Electrophoresis* 2004, 25, 733-742.

Curriculum Vitae

Jana Svobodová

Born: 5th June 1984

Department of Physical and Macromolecular Chemistry
Faculty of Science
Charles University in Prague
Hlavova 8
Prague 2 128 43
Czech Republic
E-mail: svobod.j@seznam.cz
Phone: +420-221951399

Education

- 2008 - *PhD student: Physical Chemistry*
Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Topic of PhD thesis: Enantioselective separation systems in capillary electrophoresis
- 2006 – 2008 *Master degree: Physical Chemistry*
Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Diploma work: Determination of rate constants of interconversion of chiral compounds by means of capillary electrophoresis
- 2003 – 2006 *Bachelor degree: Chemistry*
Faculty of Science, Charles University in Prague, Czech Republic

Bachelor work: Study of interconversion of lorazepam in chiral cyclodextrin environment

Practical Training / Internships

- 2012
3 weeks *Research group of Prof. Vigh, Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX, USA*
Simulations of chiral separation systems in capillary electrophoresis
- 2011
3 weeks *Research group of Prof. Armstrong, Department of Chemistry, UT Arlington, Arlington, TX, USA*
Cyclofructans as suitable chiral selectors for CZE
- 2010
1 month *Research group of Prof. Schmid, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of Graz, Graz, Austria*
Borate complexation of selected compounds in CZE

2009 6 months	<i>Hawaii Natural Energy Institute, University of Hawaii at Manoa, Honolulu, Hawaii, USA</i> Study of AAEM Fuel Cells
2009 3 weeks	<i>Research group of Prof. Dibo, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary</i> Chiral separations using capillary electrophoresis and other analytical techniques
2007 3 months	<i>Research group of Prof. Kenndler, Institut für Analytische Chemie und Lebensmittelchemie, University of Vienna, Vienna, Austria</i> Determination of rate constants of lorazepam in chiral environment
2005 3 months	<i>ZSW (Zentrum für Sonnenenergie- und Wasserstoff- Forschung), Ulm, Germany</i> Study of fuel cell's catalysators based on Pt-Ru

Related experiences

- **Participation in Projects:**
 - *Characterization of interconversion of enantiomers in chiral environment,*
PI: J. Svobodová
Project of the Grant Agency of Charles University in Prague, Registration No. : GAUK 101309
 - Participation in the three more projects of Grant Agency of Charles University in Prague, Registration No. : GAUK 51009; GAUK 323611, GAUK 669412
 - Participation in the Project of the Czech Science Foundation, Registration No. :GA 203/071353
 - Participation in the project Registration No.: Kontakt LH11018.
- **Awards:**
 - *4th place Jean-Marie Lehn Prize in chemistry 2011*
 - *3rd place Poster competition at 12th Symposium and Summer School on Bioanalysis, July 2012, Cluj Napoca, Romania;*
Poster entitled "Prediction of electromigration order reversal and other unforeseen phenomena in chiral CZE"
- **Teaching Activities:**
 - Exercises of Physical Chemistry I b / II b
 - Practical Course in Physical Chemistry
- **Certificates:**
 - Toefl IBT – 11.3.2011, 108 pts.

List of Publications:

1. Model of enantioseparation systems with a mixture of chiral selectors: I Theory
P. Dubský, **J. Svobodová**, B. Gaš
Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the biomedical and life sciences
2008, 875, 30-34
2. Model of enantioseparation systems with a mixture of chiral selectors: II. Determination of thermodynamic parameters of the interconversion in chiral and achiral environments separately
P. Dubský, **J. Svobodová**, E. Tesařová, B. Gaš
Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in the biomedical and life sciences
2008, 875, 35-41
3. Occurrence and behavior of system peaks in RP HPLC with solely aqueous mobile phases
K. Kalíková, V. Hruška, **J. Svobodová**, R. Chudoba, B. Gaš, E. Tesařová
Journal of Separation Science 2009, 32, 2864-2870
4. Enhanced selectivity in CZE multi-chiral selector enantioseparation systems: Proposed separation mechanism
P. Dubský, **J. Svobodová**, E. Tesařová, B. Gaš
Electrophoresis 2010, 31, 1435 - 1441
5. Accuracy and sensitivity of the determination of local rate constants of interconversion by dynamic enantioselective electrophoresis
J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš
Electrophoresis 2011, 32, 595 – 603
6. Methods for determination of all binding parameters in systems with simultaneous borate and cyclodextrin complexation
J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, M. Beneš, B. Gaš
Journal of Chromatography A 2011, 1218, 7211-7218
7. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis:
I.Mathematical model
V. Hruška, M. Beneš, **J. Svobodová**, I. Zusková, B. Gaš;
Electrophoresis 2012, 33, 938-947
8. Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis:
II.Experimental verification
J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, K. Ušelová, B. Gaš
Electrophoresis 2012, 33, 948-957
9. Determination of stability constants of complexes of neutral analytes with charged cyclodextrins by capillary zone electrophoresis
M. Beneš, I. Zusková, **J. Svobodová**, B. Gaš
Electrophoresis 2012, 33, 1032-1039

10. A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part III. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte. Theory
V. Hruška, **J. Svobodová**, M. Beneš, B. Gaš;
Journal of Chromatography A 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.086>
11. A nonlinear electrophoretic model for PeakMaster: Part IV. Electromigration dispersion in systems that contain a neutral complex-forming agent and a fully charged analyte.
Experimental verification
M. Beneš, **J. Svobodová**, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš
Journal of Chromatography A 2012, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2012.06.053>
12. Simulation of the effects of complex formation equilibria in electrophoresis: III. Simultaneous effects of chiral selector concentration and background electrolyte pH
J. Svobodová, M. Beneš, P. Dubský, G. Vigh, B. Gaš
Electrophoresis, 2012 accepted

Conferences:

○ Lectures:

1. Enantioseparation in single-chiral selector and multi-chiral selector systems

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

10th International Symposium and Summer School of Bioanalysis, July 2010, Zagreb, Croatia

2. Comparison of single-chiral selector and multi-chiral selector enantioseparation systems

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

ITP 2010, 17th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, August 2010, Baltimore, MD, USA

3. Simul 5 – Complexation equilibria in simulations of electrophoresis

J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš

ITP 2011, 18th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques, August 2011, Tbilisi, Georgia

4. Simul 5 – Let's simulate chiral separations

J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš

11th International Symposium and Summer School of Bioanalysis, September 2011, Graz, Austria

5. Simulations as useful tool to master chiral separations in CZE

J. Svobodová, M. Riesová, M. Beneš, E. Tesařová, V. Hruška, B. Gaš

Chirality 2012, 24th International Symposium on Chirality, June 2012, Fort Worth, TX, USA

○ Posters:

1. Characterization of interconversion of chiral compounds in chiral environment

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

Chirality 2009, 21st International Symposium on Chirality, July 2009, Breckenridge, CO, USA

2. Characterization and development of Alkaline Anion Exchange Membrane Fuel cells powered by alkaline-glycerol solution

J. Svobodová, G. Bender, M. Angelo, J. Downar, S. Ragsdale, R. Rocheleau

Fuel Cell Seminar 2009, November 2009, Palm Springs, CA, USA

3. Enantioseparation mechanisms and determination of optimal chiral selector concentration in single and multi-chiral selector systems

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

Chiranal 2010, February 2010, Olomouc, Czech Republic

4. Enantioseparation in single and multi-chiral selector systems. Is there any difference?

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, B. Gaš

MSB 2010, 25th International Symposium on Microscale Bioseparations, March 2010, Prague, Czech Republic

5. Methods for determination of all binding parameters in systems with simultaneous borate and cyclodextrin complexation

J. Svobodová, P. Dubský, E. Tesařová, M. Beneš, B. Gaš

Nordic Separation Science Society 6th Conference, August 2011, Riga, Latvia

6. Simul 5 Complex - Simulation of the effects of complex-formation equilibria in electrophoresis

J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, I. Zusková, B. Gaš

CECE 2011, 8th International Interdisciplinary Meeting on Bioanalysis, November 2011, Brno, Czech Republic

7. Simulations as a powerful tool for prediction of the optimal separation conditions in CZE

J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, G. Vigh, B. Gaš

HPLC 2012, 38th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, June 2012, Anaheim, CA, USA

8. Prediction of electromigration order reversal and other unforeseen phenomena in chiral CZE

J. Svobodová, M. Beneš, V. Hruška, G. Vigh, B. Gaš

12th Symposium and Summer School on Bioanalysis, July 2012, Cluj Napoca, Romania

Notes: